

固定化酵素応用センサ

Immobilized Enzyme Sensor

このたび日立製作所は、薄くて緻密なスキン層と多孔性のスポンジ層から成る非対称膜の孔中に、グルコースオキシダーゼを固定化した酵素膜を作り、これとH₂O₂電極とを組み合わせ、グルコース測定用固定化酵素応用センサを開発した。

このセンサは、応答速度が速く、安定長寿命で、しかも全血試料も測定できる。また、このセンサを用いてフロー式のグルコース分析装置を組み立てると、小形で単純な機構にもかかわらず、測定範囲が0~1,000mg/dl、膜1枚当たりの分析件数が2,000件以上、分析能力も150~200件/時間で優れた特性を示す。

したがって、全血試料を用い、ベッドサイドで迅速に分析結果を出さねばならぬ緊急検査装置用センサに最適である。

唐沢吉治* *Yoshiharu Karasawa*
 小角博義* *Hiroyoshi Kokaku*
 高亀 寿* *Hisashi Kôkame*

1 緒 言

近年、医療診断には、血液や尿などの生体液の諸成分を分析し、病態の把握を行なう臨床化学検査が不可欠となっている。最近では、特に急患や手術中の患者などの病状を的確につかむための緊急検査が重要となっており、この目的に合った緊急検査装置の開発が要求されている。この装置は、一刻を争う緊急処置の参考データを得るために使われるので、試料としては全血(採血したままの血液)が使用可能で、操作が簡単で、迅速に分析結果を出し、しかもベッドサイドに持ち込めるほど小形軽量であることが望まれる。しかし、従来の比色法による分析計ではこの目的に合致させることは困難で、新しいセンシング方式の分析装置が必要である。

本稿は、上記目的に合った装置の新しいセンサ、及びそれに用いた酵素膜について述べる。

2 固定化酵素応用センサの原理

酵素は生体中での各種化学反応の触媒で、それぞれの酵素は、ある特定の物質だけに触媒作用を示す性質、いわゆる反応特異性をもっている。

固定化酵素応用センサは、この酵素の反応特異性を利用した化学物質を検知するセンサである。その基本構造は、図1に示すように酵素を固定化(酵素を物理的、化学的に担体に結合させることにより、不溶化、安定化させること)した膜と、電気化学的検知装置であるベースセンサの二つの部分から成る。その動作原理は、以下に述べるとおりである。

試料が酵素膜に触れると、その中に固定化されている酵素の反応特異性により、試料中の一成分だけが化学反応を起こし、これによって増減する物質をベースセンサで測定する。

ベースセンサとしては、現在までにH₂O₂、O₂などのポーラロ形の電極や、H⁺、NH₄⁺、CN⁻、I⁻などのイオン電極、また最近では特殊なFET(電界効果形トランジスタ)などが知られている。

上記の原理をグルコースの測定例で以下に説明する。

グルコースオキシダーゼ



グルコースは上式で示めすように、グルコースオキシダーゼにより選択的に酸化され、グルコン酸になる。このときO₂が

減少したり、H₂O₂が生成されるので、これをO₂又はH₂O₂電極で測定することによりグルコースを間接的に測定できる。

3 センサ用酵素膜

最初の固定化酵素応用センサはUpdike¹⁾らにより1967年に報告された。それ以来、各方面で多くの研究^{2),3)}が行なわれたが、実用化されたものは極めて少ない⁴⁾。この最大の原因は、実用化に適するセンサ用酵素膜の開発が困難であったためと思われる。

従来の代表的な酵素膜は、図2の模式図に示したように、(a)ポリアクリルアミドのようなゲルの中に包括したもの、(b)アルブミンのようなマトリックス物質と架橋させたもの、(c)コラーゲンのようなフィブリルに吸着させたもの、(d)セロファンなどの表面に化学結合させたもの、(e)特殊な2枚の膜の間に酵素をラミネートしたものなどがある。しかし、これらの酵素膜は、医療分析計のセンサ用として備えていなければならない条件、すなわち、高活性、安定性と寿命、物質の高透

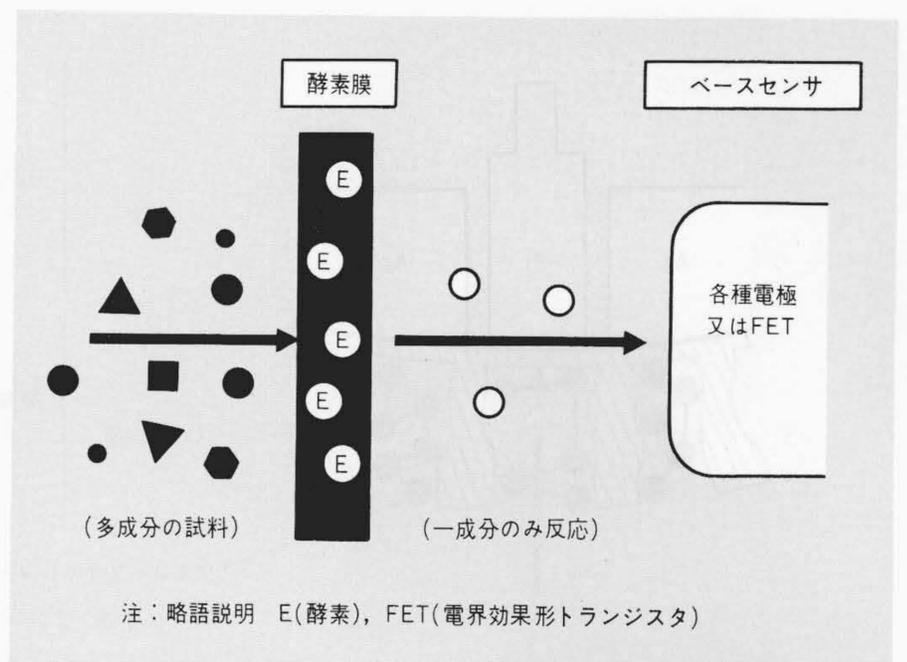


図1 固定化酵素応用センサの原理 酵素膜は、検知する物質を選択し、ベースセンサが検知できる物質に変換する。

* 日立製作所日立研究所

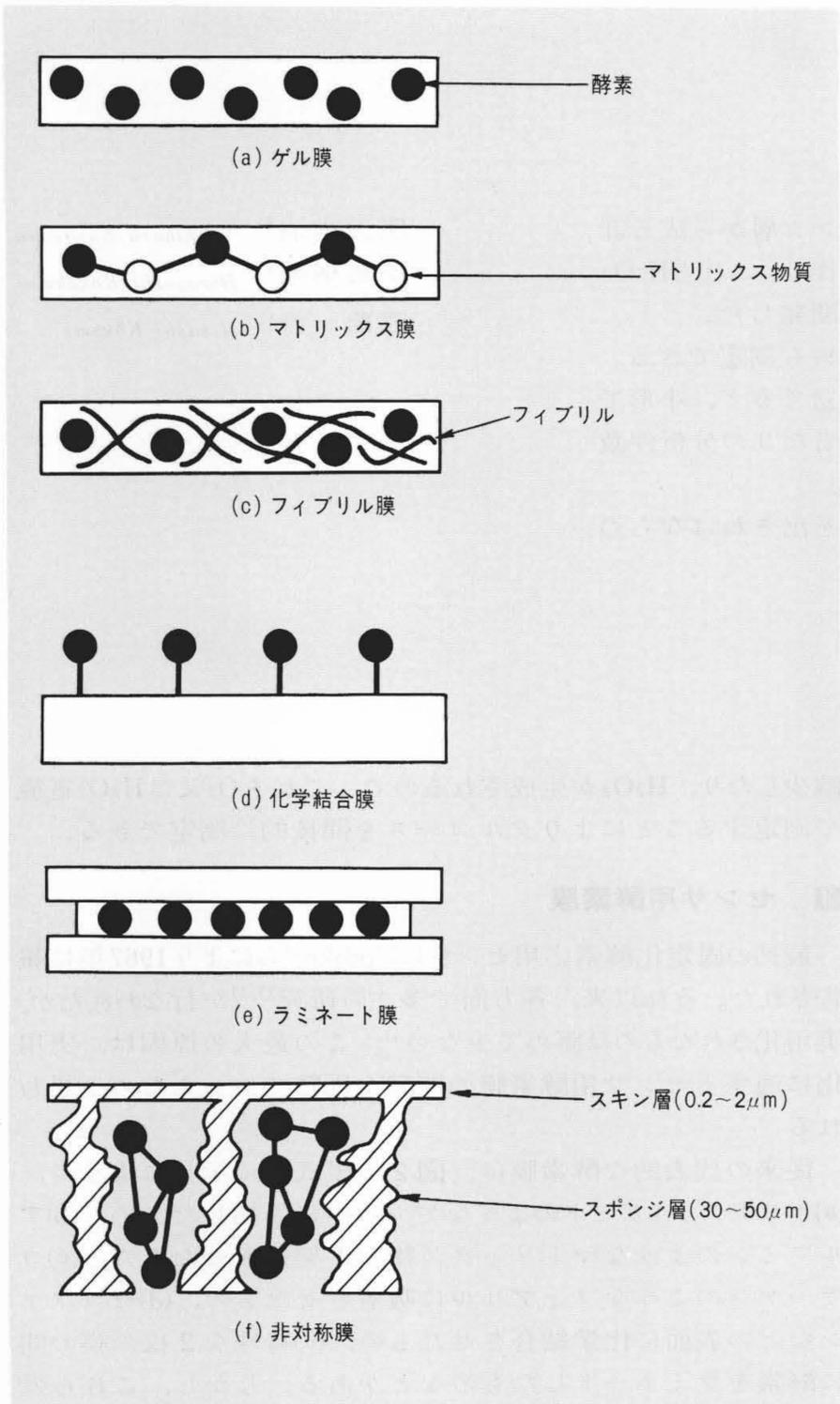


図2 各種の酵素膜 新酵素膜は、非対称膜の孔中に酵素を固定してある。

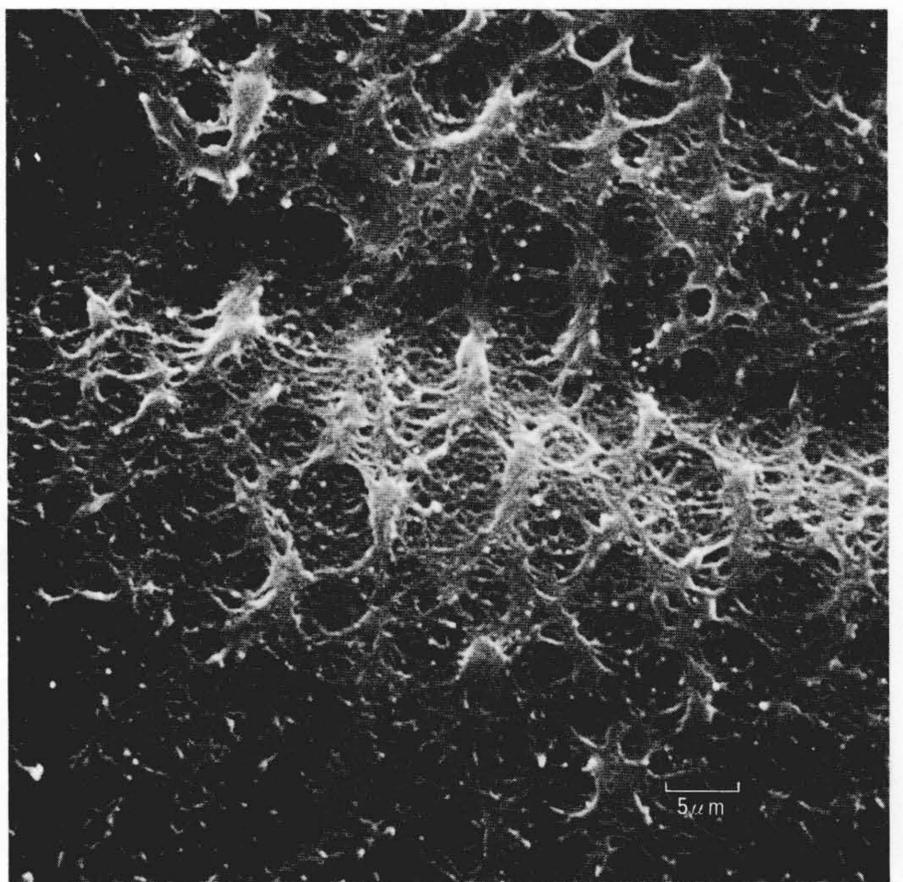


図3 酵素膜(スポンジ層断面)の電子顕微鏡写真 酵素は架橋させ、固定化されている。

過拡散性、機械強度、耐汚染性、耐測定妨害物質性、品質安定性などを必ずしも満足しない。

そこで、日立製作所は上記の条件を考えて図2の(f)に示すような新しいセンサ用酵素膜を開発した。この膜は薄くて緻密なスキン層と、それより厚い多孔性のスポンジ層から成るアセチルセルロースの非対称膜に酵素を内蔵させた後、架橋固定化したものである。そのため、以下に述べるような優れた特長がある。

- (1) 酵素がスポンジ層に多量に固定されているので高活性であること。
- (2) 孔中に固定されているため物理的、化学的に安定で、長

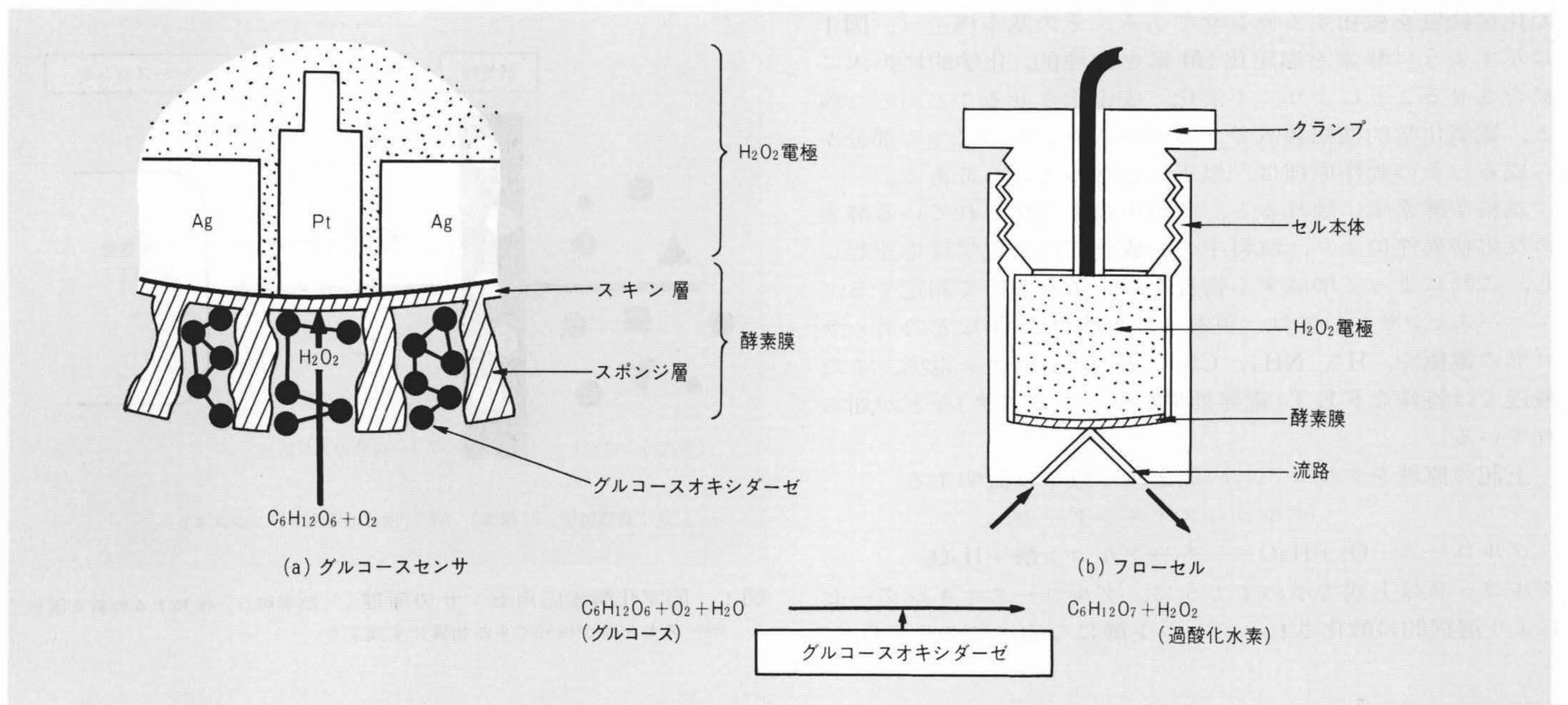


図4 グルコースセンサとそのフローセル グルコースセンサを付けたフローセルは、連続的に計測できる。

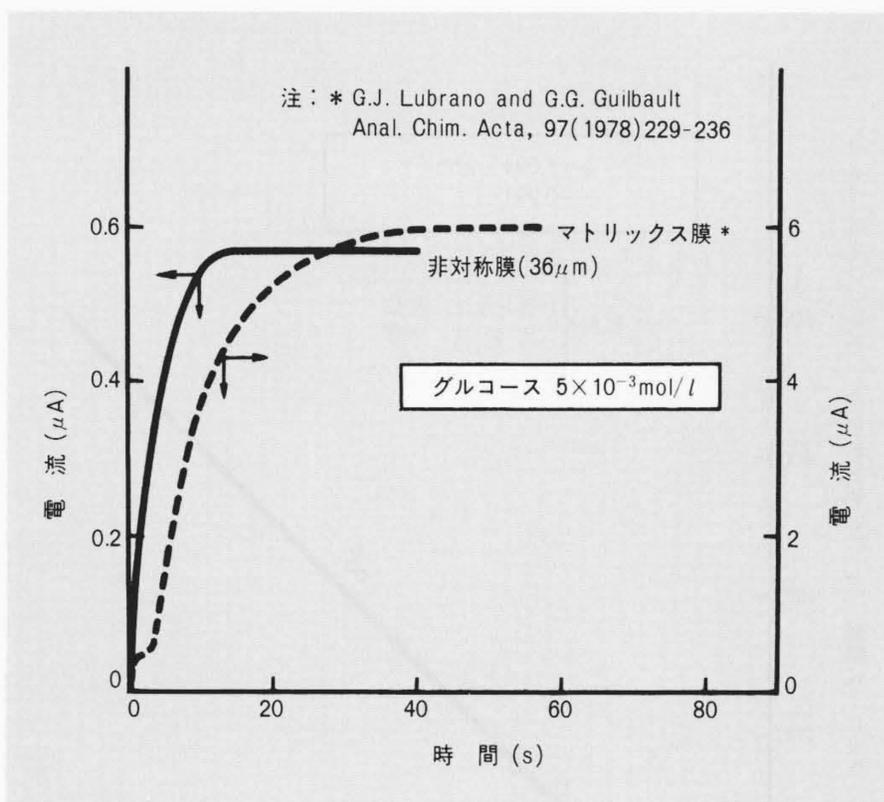


図5 グルコースセンサの応答性 非対称膜を使用しているため応答性が速い。

寿命であること。

- (3) 緻密なスキン層は非常に薄いため、拡散透過性が良いこと。
- (4) スポンジ層が厚いため機械的強度があること。
- (5) 担体のアセチルセルロースは、血球、タンパク質に対して汚れにくく、スポンジ層の孔径はそれらよりも小さいため孔中に侵入しないこと。
- (6) 製膜、固定化条件により、スキン層は H_2O_2 、 O_2 、 H_2O 、塩類などの低分子物だけを通し、アスコルビン酸などの測定妨害物の影響を実質上排除できること。

この膜の電子顕微鏡写真を図3に示す。

4 グルコースセンサ

グルコースオキシダーゼを固定化した酵素膜と、ポーラロ形の H_2O_2 電極とを組み合わせると、2章で述べた原理によりグルコースを測定できる固定化酵素応用センサ(以下、グルコースセンサと称する。)が得られる。この構造を図4の(a)に示す。ポーラロ形の電極は、貴金属の作用面と酵素膜の間に通常電極膜が必要であるが、新酵素膜ではスキン層がその役を行なうため不要である。したがって、酵素膜自体の拡散透過性が良いことも加えて、応答性は図5に示すように、約15秒と非常に速い。

5 フロー式グルコース分析計

5.1 性能

グルコースセンサを図4の(b)に示すフローセルに取り付け、これを用いて図6に示すようなフロー式グルコース分析装置を組み立てた。図7は、この装置でグルコース液を測定した結果を示すものである。これより明らかなように、わずか $10\mu l$ のサンプルを注入すれば、約15秒で分析結果が得られるので、緊急検査装置に必要な迅速性を十分備えている。また、グルコースの濃度比例性も良く、更には、キャリオーバーもない。図8に示す検量線でも明らかなように、サンプル量と流速を変えることにより、測定範囲も $1,000mg/dl$ にも広がる。このため、重症の糖尿病患者の血液も希釈せずに測定が可能である。

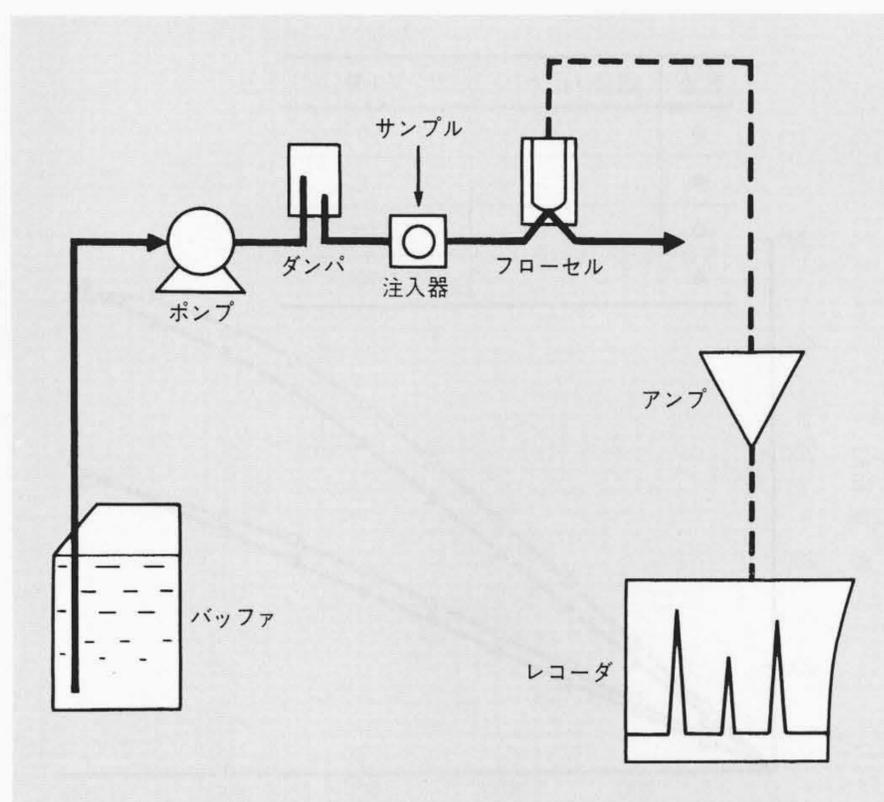


図6 グルコースセンサを使用したフロー式分析装置 分析時間が短く、全血の分析が可能である。

5.2 全血の分析

前述したように、一刻を争う緊急検査では、血液を遠心分離して血漿や血清にして測定する余裕はないので、全血試料で測定できることは不可欠の要件である。新酵素膜を備えたセンサは、スポンジ層表面の孔径は血球やタンパク質の径よりも小さく、フィルタの役目を果たすので、全血をそのまま測定できる。図9に示すように、試料として全血を用いても比色法と良い相関関係を示す。

以上、グルコースセンサとフロー式のグルコース分析装置

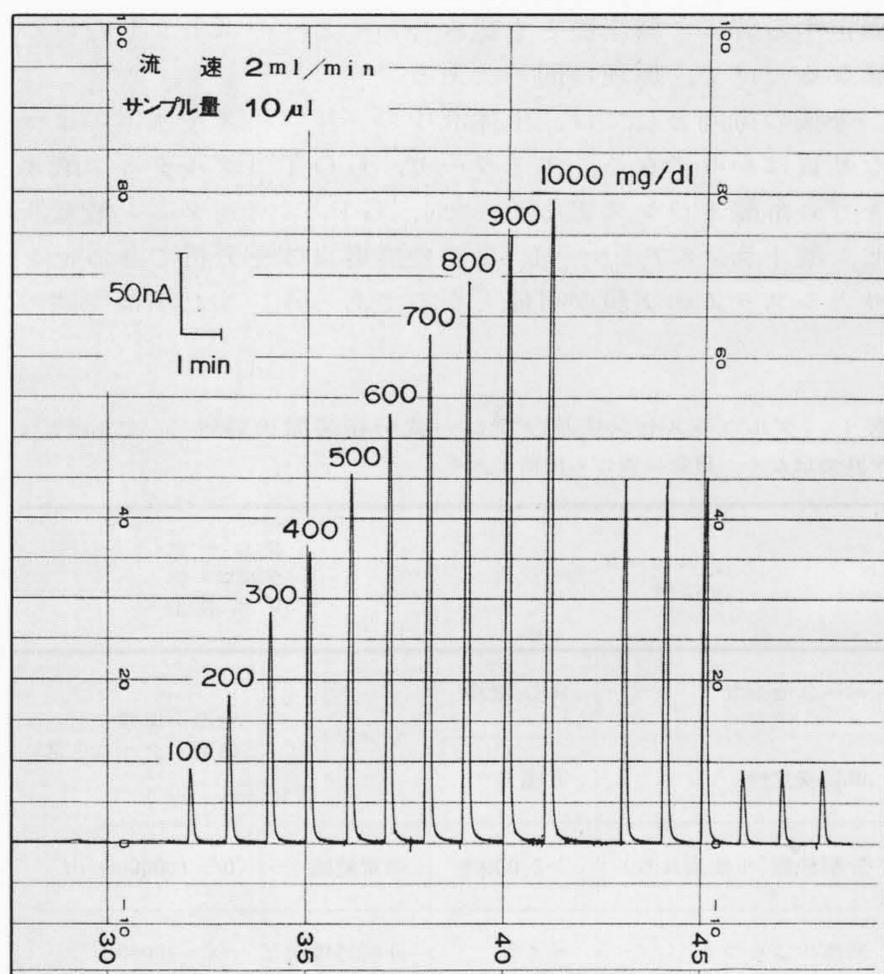


図7 フロー式グルコース分析装置の測定結果 濃度比例性、再現性が良いことが分かる。

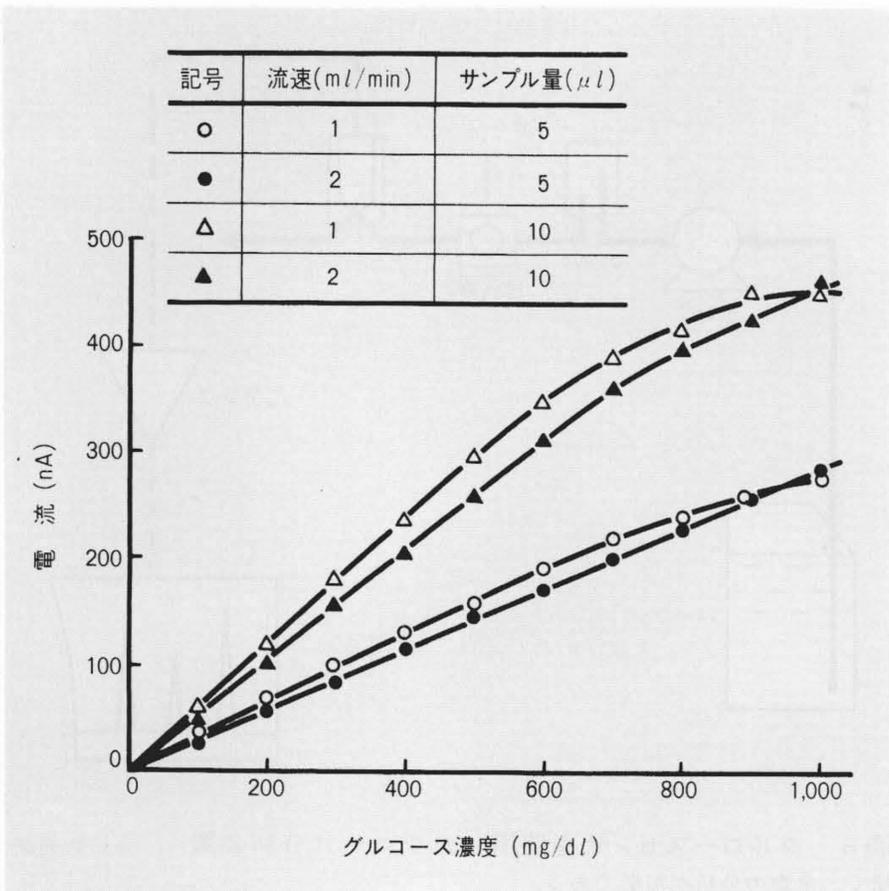


図8 グルコースの検量線 グルコース濃度1,000mg/dlまで測定が可能である。

の特性を表1に示す。これらによっても明らかのように、固定化酵素応用センサは緊急検査装置ばかりでなく、このようなセンサを多数備えた、中央検査室用の多項目分析計に応用できる可能性がある。

6 固定化酵素センサの展開

今回はグルコースセンサだけにしか触れなかったが、日立製作所は既に、尿素、尿酸、コレステロール、マルトースなどを測定できる固定化酵素応用センサを試作した。これらは、固定する酵素と酵素膜とを組み合わせるベースセンサだけが異なるだけで、原理は同一である。

今後の方向としては、生体液中のグルコースや尿素のような基質ばかりでなく、アミラーゼ、GOT(グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ)、GPT(グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ)などの酵素自体を分析できるセンサとシステムの実現が可能となるであろう。また本稿で述べ

表1 グルコースセンサ及びフロー式分析装置の特性 緊急検査ばかりではなく、日常検査にも使用できる。

グルコースセンサ		フロー式グルコース分析装置	
ベースセンサ	H ₂ O ₂ 電極	サンプル	全血：血漿 血清：グルコース
保管安定性	6箇月		
分析件数(1枚当たり)	>2,000件	測定範囲	0~1,000mg/dl
活性のばらつき	±4%	分析処理数	150~200件/h
レスポンス	15s	再現性	2.5%(全血)

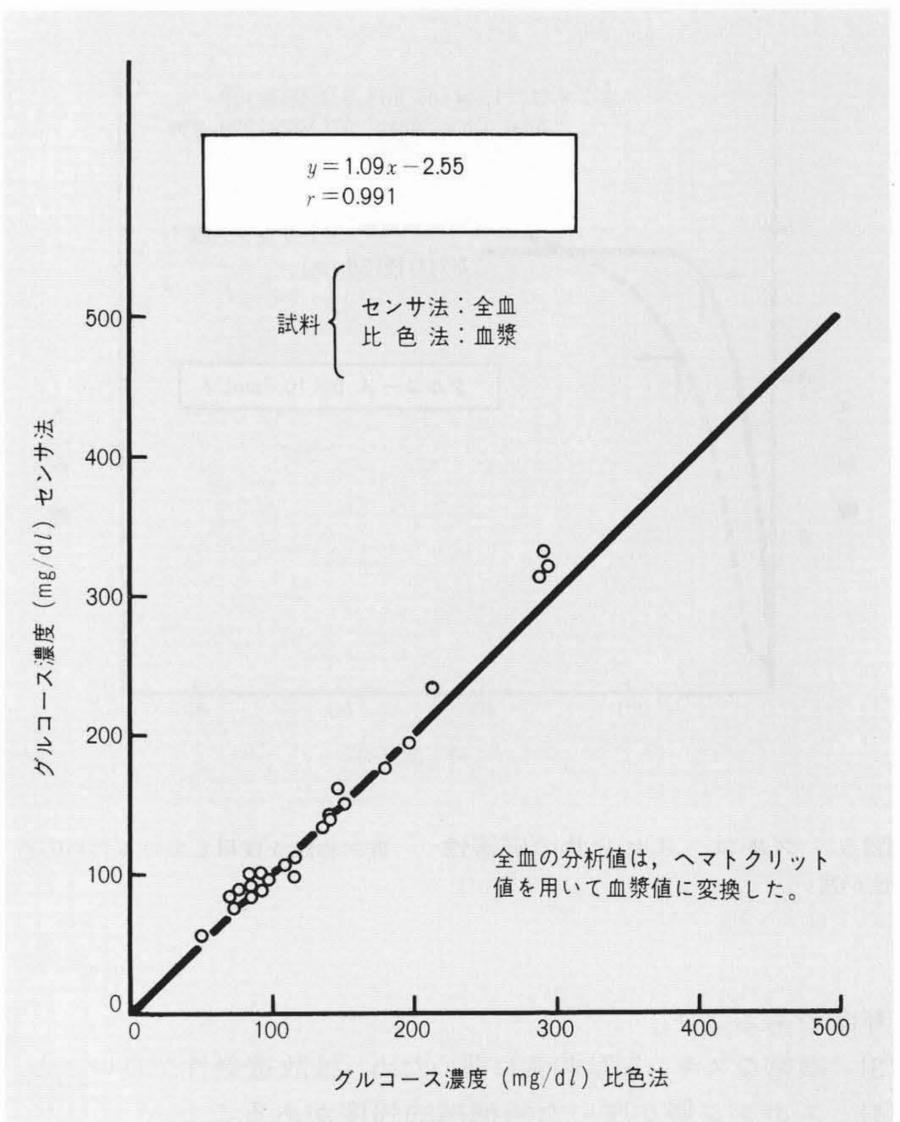


図9 フロー式分析装置による全血の分析 従来の分析計(比色法)とよく相関する。

た新固定化膜は、酵素ばかりでなく、微生物、抗体、オルガネラ、その他生理活性物質の固定が同一の手法で固定化できるため、このような固定化膜と各種ベースセンサとを組み合わせた新しいセンサに発展できる可能性がある。

また、固定化酵素応用センサは医療分析計のセンサとして使われるほか、発酵、食品工業などのプロセス制御用センサとしても使用できる。更には小形化することにより、人工臓器のセンサとしても発展が可能である。

7 結 言

スキン層とスポンジ層から成る非対称膜に、グルコースを固定化した酵素膜を作り、これをH₂O₂電極と組み合わせてグルコース測定用固定化酵素応用センサを開発した。このセンサとそれを備えたグルコース分析装置は、(1)安定で長寿命であること、(2)応答性が約15秒と速いこと、(3)全血試料がそのまま分析可能であること、(4)フロー式分析装置なので、分析処理能力が150~200件/時間と大きいこと、(5)装置の機構が単純で小形化が可能であることなどの優れた特性をもっている。このため、ベッドサイドで迅速に分析する必要のある緊急検査装置のセンサとして適している。

参考文献

- 1) S.J.Updike,G.P.Hicks:Nature,214,986(1967)
- 2) G.G.Guilbault"Handbook of Enzymatic Analysis",Academic Press,N.Y.(1976)
- 3) 千畑一郎編:固定化酵素,講談社(1975)
- 4) D.N.Gray,M.H.Keyes and B.Watson:Anal.Chem.49, No.12,1067(1977)